

Westernblot - Lösungshinweise

Aufgabe 1: Die Übertragung der Biomoleküle von Gelen auf Membranen vor dem eigentlichen Nachweis bringen einige Vorteile mit sich. Nennen Sie die wichtigsten!

Membranen sind deutlich länger haltbar und können mit Reagenzien behandelt werden, ohne in Mitleidenschaft gezogen zu werden.

Aufgabe 2: Was ist mit dem Begriff native PAGE gemeint?

PAGE ohne denaturierende oder linearisierende Hilfsstoffe (SDS, DTT, Mercaptoethanol) → Trennung ist sehr schonend, Tertiärstruktur bleibt erhalten. Trennung erfolgt aufgrund der Molekülmasse, aber auch der Stromlinienform und der Ladung.

Aufgabe 3: Geben Sie den Inhalt stichwortartig auf deutsch wieder.

Um eine Immundetektion zu ermöglichen, werden die Banden mit elektrischem Strom auf eine Nitrocellulose oder PVDF-Membran übertragen. Die Membran wird dabei Seite an Seite an das Gel angelegt. Nitrozellulose: kostengünstiger, aber weniger haltbar und nicht so resistent gegenüber Chemikalien.

Aufgabe 4: Erklären Sie die Lage/Orientierung der Membran

Die Proteine sind auf dem Gel negativ geladen (z.B. wegen SDS, und/oder umgebenden pH-Wert). => Werden beim Blotting zum Pluspol hin gezogen! → Membran ist in Richtung Pluspol angeordnet.

Aufgabe 5: Erklären Sie den Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Markierung.

spezifische Markierung: Beruht auf Schlüssel-Schloss-Prinzip. Es werden Analyte an genau passende („maßgeschneiderte“) Nachweismoleküle gebunden.

Aufgabe 6: Interpretieren Sie das Versuchsergebnis (siehe Beschreibung + Abb. 4) und was genau mit Schritt 1, Schritt 2 und mit Schritt 3 gezeigt wurde.

Zu Bild 2: Durch das Stripping wurde der Primär-AK entfernt, da mit einem markierten Sek-AK keine Bande mehr entsteht.

Zu Bild 3: Damit wird bewiesen, dass Lactoglobulin das Stripping unbeschadet überstanden hat. Spezifischer Nachweis ist nämlich möglich.

Aufgabe 7: Vgl. Abb. 5: Ergebnisse eines HIV-Bestätigungstests (Western Blot). Für was stehen „PC“ und „NC“? Diskutieren Sie, bei welchem Patient ein positives, ein negatives oder ein indifferentes Testergebnis vorliegt.

PC: positive control. Positivkontrolle. Zeigt, dass der Test sichtbare Banden bildet, wenn die entsprechenden Antigene vorhanden sind.

NC: negative control. Negativkontrolle. Zeigt, dass tatsächlich keinen Banden zu sehen sind, wenn die entsprechenden Antigene fehlen.

- Patient 0224 und 0157 und zeigen viele HIV-spezifische AK in ihrem Blutserum. → HIV nahezu sicher. sicher.
- Patient 0145 zeigt auch mehrere HIV-spezifische AK → HIV sehr wahrscheinlich.
- Patient 0226: Wenige HIV-spezifische AK vorhanden. → indifferentes Ergebnis. → Untersuchung wiederholen, z.B. auch in einem anderen Labor mit anderen Reagenzien.
- Patient 0147: Keine HIV-spezifischen AK nachweisbar. HIV wahrscheinlich nicht oder in einem so frühen Stadium, dass man noch nicht nachweisen kann ODER antiretrovirale Therapie so gut, dass keine AK im Blutserum nachweisbar, obwohl Patient infiziert ist.

⇒ **MAN ERKENNT**; das auch der Westernblot nicht immer eindeutige Ergebnisse liefert. Die Ergebnisse müssen immer interpretiert werden und häufig gibt es Interpretationsspielraum. GLP und Qualitätsstandards in den Laboren schaffen hier standardisiertes Vorgehen.

Aufgabe 8

Irgendein IgG-AK wurde fixiert, so dass hier garantiert der markierte Sekundär-AK (Nachweisreagenz) bindet. Dient auch der Positiv-Kontrolle und zeigt, dass das Nachweisreagenz prinzipiell funktioniert.

Aufgabe 9: Interpretieren Sie die Abb. 6: Skalierung im Verlauf, Zuordnung zu Strukturen durch Vergleich mit HIV.

Auf dem Membranstreifen sind charakteristische Ag des HI-Virus der Proteingröße (in kDa = kg/mol) nach aufgebracht. (=> Trennung in der SDS-PAGE nach Proteingröße!!!! Es handelt sich um ein logarithmische Auftrennung. BEISPIEL: So liegen die Banden p15 und p17 gut getrennt nebeneinander, mit deutlichem Abstand, obwohl der Massenunterschied nur 2 kDa beträgt. Hingegen zeigen die Banden gp140 und gp160 ungefähr denselben Abstand zueinander, obwohl hier die Massendifferenz 10 mal größer ist, nämlich 20 kDa.)

Die Patientin oder der Patient zu dem WB-Streifen zeigt besitzt im Blutserum typischen AK gegen die meisten charakteristischen HIV-Virusproteine